



УДК 582.739:575.174+581.3(470.5)

Внутривидовая дифференциация *Astragalus clerceanus* s. l. (Craccina, Fabaceae): экологические, генетические и эмбриологические аспекты

М. С. Князев^{1,2}, Н. А. Кутлунина (†)², С. А. Зимницкая², А. Ю. Беляев³

¹ Ботанический сад УрО РАН, ул. 8 Марта 202б, г. Екатеринбург, 620144, Россия. E-mail: knyasev_botgard@mail.ru

² Уральский федеральный университет, пр. Мира 19, г. Екатеринбург, 620002, Россия

³ Институт экологии растений и животных УрО РАН, ул. 8 Марта 202а, г. Екатеринбург, 620144, Россия

Ключевые слова: аллозимный анализ, генетическое разнообразие, микроэволюционная адаптация, система размножения, *Astragalus*.

Аннотация. Исследован генетический полиморфизм, эмбриологические и антекологические характеристики в семи популяциях *Astragalus clerceanus* s. l. (шести природных и одной интродукционной). Приведены сведения о существенных экологических различиях популяций вида в двух обособленных частях ареала. Отмечено предпочтение к геохимическому составу подстилающей горной породы – карбонатов – у южных и избегание таких пород у северных растений. По данным изоферментного анализа показан высокий уровень генетического полиморфизма; во всех популяциях выявлены уникальные аллели; в большинстве популяций установлен дефицит гетерозигот, что, вероятно, связано с инбридингом. По частотам аллелей ряда аллозимных локусов отмечены значительные межпопуляционные различия даже у географически близких популяций, что наиболее естественно объяснить стохастическими процессами (дрейф генов, эффект основателя и пр.) в изолированных популяциях. Показаны: 1) статистически достоверное различие ($p < 10^{-5}$) по частотам аллелей аллозимных локусов между южной и северной группами популяций, 2) значительные различия по эмбриологическим и антекологическим характеристикам между этими группами. Это свидетельствует о значимых эволюционных преобразованиях *Astragalus clerceanus* s. l. и подтверждает правомерность его разделения на два подвида.

Intraspecific differentiation of *Astragalus clerceanus* s. l. (Craccina, Fabaceae): environmental, genetic and embryological aspects

M. S. Kniazev^{1,2}, N. A. Kutlunina (†)², S. A. Zimnitskaya², A. Yu. Belyaev³

¹ Botanical Garden, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Vosmogo Marta, 202b, Yekaterinburg, 620144, Russia

² Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, ul. Mira, 19, Yekaterinburg, 620002, Russia

³ Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Vosmogo Marta, 202a, Yekaterinburg, 620144, Russia

Keywords: allozyme analysis, *Astragalus*, genetic diversity, microevolution adaptation, propagation system.

Summary. The genotypic diversity, embryological, and anthecological characteristics in six natural and one introduced populations of *Astragalus clerceanus* s. l. were investigated. The information about significant environmental differences in the two parts of its area was given (including the decided preference limestone and dolomite by the southern plants and avoidance such substrates – by the northern). According to the allozyme analysis the high levels of genetic polymorphism was shown and unique alleles were identified in all populations. In the most populations het-

erozygote deficit was determined that was probably due to the inbreeding phenomenon. On the several allozyme loci allele frequencies differences were marked even in geographically close populations, suggested the presence of the gene drift in isolated populations. Genetic divergence (difference is significant $p < 10^{-5}$) between southern and northern groups of populations, as well as its large embryological differentiations were shown. Therefore, the separation of *Astragalus clerceanus* s. l. in two subspecies was valid that demonstrated considerable microevolution transformation of the species.

Введение

И. М. Крашенинников (Krashennikov, 1939), а вслед за ним П. Л. Горчаковский (Gorczakovskyi, 1969), рассматривая особенности видообразования у растений на Урале, отмечали дивергенцию близких видов по экологическим особенностям, например, когда один вид лесной, а другой – степной или скальный.

Astragalus clerceanus Iljin et Krasch. (астрагал Клера) был описан в начале прошлого века по материалу, собранному на известняковых обнажениях в правобережной части бассейна р. Белая на Южном Урале (Il'in, Krashennikov, 1924), как горно-лесостепной уральский эндемик, обособившийся от широко распространенного степного *A. austriacus* Jacq. В ходе последующих исследований (Gorczakovskyi, 1969; Mikhailova, 1989; Kniazev, 1994, 2007; Kulikov, 2005; Kniazev, Kulikov, 2008; Maslova, 2011) выявлено более 30 местонахождений вида. Установлено разобширение ареала на южный и северный фрагменты. Южный фрагмент компактный, охватывает южную часть бассейна р. Белая; северный фрагмент расположен на Среднем Урале и в северных районах Южного Урала, представлен серией разрозненных местонахождений по долинам рек Чусовая, Тагил и некоторым сопредельным территориям. В промежуточных между этими фрагментами районах (бассейны рек Сытва, Уфа, Ай, Сим, Юрюзань) *A. clerceanus* отсутствует, хотя подходящие для него местообитания имеются. На основании наблюдений в полевых условиях, критического анализа гербарного материала ряда отечественных коллекций (SVER, PERM, LE, MW) были получены данные о дифференциации *Astragalus clerceanus* на лесостепную (в бассейне р. Белая) и лесную расы, по всей видимости, подвидового уровня. Интересно, что лесостепная раса произрастает исключительно на известняках и доломитах, тогда как лесная избегает эти горные породы.

Под действием естественного отбора в различающихся условиях могли сформироваться и некоторые морфологические отличия. Действительно, было показано (Kniazev, 2007), что растения из северного фрагмента ареала устойчиво

отличаются от южных образцов восходящими и полегающими стеблями, более узкими изогнутыми бобами, более длинными цветоножками и другими признаками, на основании чего северный вариант *A. clerceanus* был описан как *A. clerceanus* subsp. *graniticus* Kniaz.

Цель данной работы состояла в проведении сравнительного анализа групп популяций северного и южного фрагментов ареала *A. clerceanus* s. l. (относимых к разным подвидам) с использованием методов аллозимного анализа, сравнительной эмбриологии и антэкологии для оценки характера и глубины микроэволюционных преобразований исходного вида.

Материалы и методы

Исследованы шесть природных популяций *A. clerceanus* s. l., а также искусственная (интродукционная) популяция «Участок», являющаяся производной от популяции «Медвежка» (интродуцирована из семян с г. Медвежка и самоподдерживающаяся в течение 40 лет в Ботаническом саду УрО РАН) (табл. 1, рис. 1).

Приготовление экстрактов, содержащих белки-ферменты, а также другие этапы изоферментного (аллозимного) анализа проводили по стандартной методике (Semerikov, Belyaev, 1995). Материалом для экстракции служили вегетативные части растений – молодые листья и верхушки побегов. Экстракты, приготовленные для анализа, хранили при -80°C в низкотемпературном морозильнике. Электрофорез проводили в 6,4%-м полиакриламидном геле в трис-ЭДТА-боратной системе по протоколу, описанному в работе В. Л. Семерикова и А. Ю. Беляева (Semerikov, Belyaev, 1995). Было апробировано 12 ферментных систем. Девять систем использованы в исследовании: ADH – алкогольдегидрогеназа (EC 1.1.1.1), 6-PGD – 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (EC 1.1.1.44), PGI – фосфоглюкоизомераза (EC 5.3.1.9), ACO – аконитаза (EC 4.2.1.3), LAP – лейцинаминопептидаза (EC 3.4.11.1), GOT – глутамат-оксалоацетат-трансаминаза (EC 2.6.1.1), FDH – форматдегидрогеназа (EC 1.2.1.2), NADHDH – никотинамид-динуклеотид дегидрогеназа (EC 1.6.99.5), IDH – изоцитратдегидрогеназа

Таблица 1

Изученные популяции *Astragalus clerceanus* s. l. и некоторые их особенности

Название популяции	Место сбора популяционных образцов растений и семян	Местообитание	Число генеративных особей
Вишнёвая	Челябинская обл., пос. Вишнёвогорск, увал Вишнёвые горы	Лугово-степной склон, на сиенитах	До 5000
Медвежка	Свердловская обл., гора Медвежка близ пос. Северка (20 км западнее Екатеринбурга)	Гранитные останцы, сосновый лес	100
Участок	С 1975 г. репродукция из семян популяции «Медвежка» в Ботаническом саду УрО РАН	Участок ботсада, почва окультурена	Колеблется от 10 до 40
Северка	Свердловская обл., близ ж.-д. ст. Северка (20 км западнее Екатеринбурга)	Гранитные останцы, сосновый лес	25
Палкино	Свердловская обл., близ ж.-д. ст. Палкино (15 км западнее Екатеринбурга)	Гранитные останцы, сосновый лес	30
Аккаваз	Республика Башкортостан, Кугарчинский р-н, Юмагузинское вдхр. на р. Белой, левый берег выше устья р. Сухой Аккаваз	Известняковые скалы	100
Караяр	Республика Башкортостан, Бурзянский р-н, правобережные известняковые скалы в урочище Караяр около 5 км ниже устья р. Кана	Известняковые скалы	До 1000

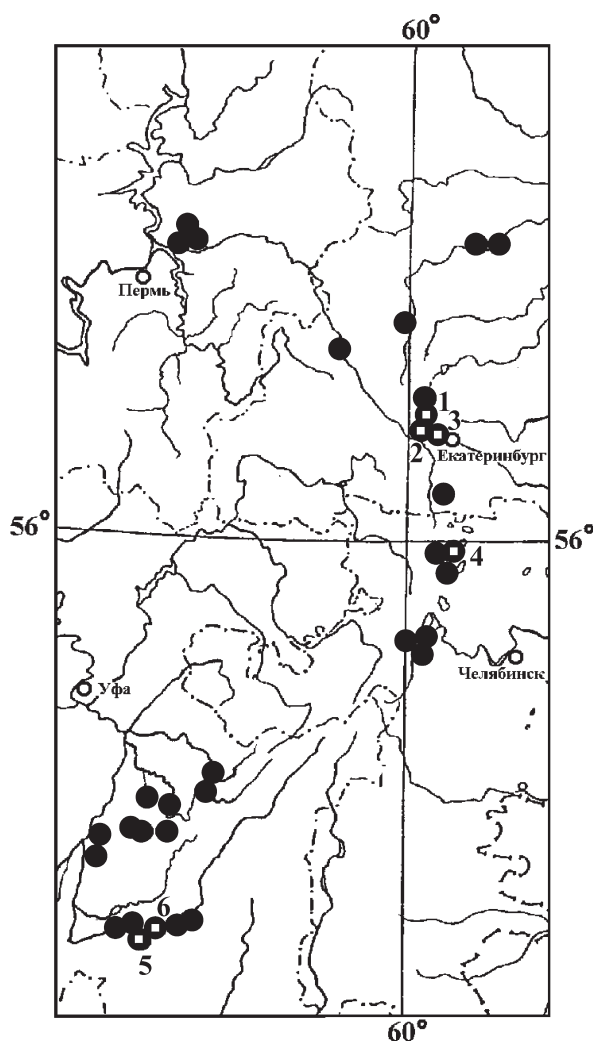


Рис. 1. Ареал *Astragalus clerceanus* s. l. и пункты сбора материала для исследований (белые метки). Цифрами обозначены изученные популяции: 1 – Медвежка; 2 – Северка; 3 – Палкино; 4 – Вишнёвая; 5 – Аккаваз; 6 – Караяр.

(ЕС 1.1.1.42). В этих системах (по совокупности всех исследованных растений *A. clerceanus*) надежно идентифицированы, интерпретированы и включены в анализ аллозимной изменчивости 3 мономорфных (*Idh*, *Got-3*, *Nadhdh-1*) и 9 полиморфных (*Fdh*, *6-Pgd-1*, *6-Pgd-2*, *Pgi-2*, *Nadhdh-2*, *Lap-1*, *Adh*, *Got-2*, *Aco*) локусов.

Обработку результатов изоферментного анализа проводили в пакете BIOSYS-1 (Swofford, Selander, 1981). Определены следующие основные показатели генетического полиморфизма: H_o – наблюдаемая гетерозиготность, H_e – ожидаемая гетерозиготность, P – процент полиморфных локусов, а также A – среднее число аллелей на локус, n_e – эффективное число аллелей, F – индекс фиксации (коэффициент инбридинга), S – доля инбредного потомства.

Генетическую структуру и степень генетической подразделенности популяций исследовали с помощью F -статистики (Wright, 1965). Количественную оценку степени генетических различий между популяциями проводили по методу, предложенному М. Неи (Nei, 1978). На основе значений коэффициентов генетической дистанции М. Неи (D_N) в программе NTSYS-рc осуществляли ординацию выборок методом главных координат (Rohlf, 1988).

Для эмбриологических исследований в тех же популяциях отбирали по одному соцветию с растения и фиксировали на месте в модифицированном растворе Карнуа (смеси этилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1). В каждой популяции соцветия собраны

не менее чем с 10 растений. В каждом соцветии цветки последовательно препарировали, начиная с самого нижнего. Анализ фертильности и стерильности мужского гаметофита проводился ацетокарминовым методом (Pausheva, 1980), учитывалось наличие фертильных и стерильных пыльцевых зерен, их соотношение, размеры, количество. Прорастание пыльцевых зерен, тип опыления, особенности женской репродуктивной сферы растений и прогамной фазы оплодотворения регистрировались и оценивались с использованием люминесцентной и световой микроскопии (микроскоп LEICA DM 5000 B) (Express-metody ..., 1988).

Для приготовления препарата пестик и тычинки подвергались мацерации 1М раствором NaOH. В качестве флуорохрома использовался раствор анилинового синего. Отмечались стерильность, деформация или различия в размерах пыльцевых зерен, их прорастание на рыльце и в пыльнике. Фиксировалось наличие пыльцевых трубок, в том числе прорастающих в пестик, прослеживался по возможности путь пыльцевой трубки до семязачатка, аномалии в строении пестика, отмечалось состояние рыльцевой поверхности. Подсчитывалось количество семязачатков в завязи. Выявлялась степень развития проводящей системы завязи и каллозных образований по интенсивности свечения семязачатков. Отмечались форма и расположение семязачатков.

Фертильность и стерильность зародышевых мешков определялись после их вычленения из тканей мацерированных семязачатков и с помощью окраски раствором йода в водном растворе йодистого калия.

Математическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ Excel и Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение

Межпопуляционная и внутрипопуляционная генетическая изменчивость

Доля полиморфных локусов у *A. clerceanus* составляет в среднем 75 %. По каждому из таких локусов обнаружено от двух до шести аллелей (табл. 2). Из выявленных 34 аллелей полиморфных локусов 17 (50) % являются редкими – встречаются с частотой менее 0,05 (5) % для вида в целом. Это относительно высокий показатель по сравнению с другими видами бобовых растений. Так, например, у эндемика Приморья *Oxytropis chankaensis* Jurtzev (Kholyna, 2005) из

40 аллелей 7 являются редкими (17,5 %). Примечательно, что редкие аллели встречаются во всех полиморфных локусах астрагала Клера. Восемь редких для вида аллелей (Fdh^2 , Aco^1 , Aco^3 , Adh^1 , $Lap-1^1$, $Got-2^1$, $Got-2^4$, $Got-2^5$) выявлены только в южных популяциях – «Караяр» и «Аккаваз» (т. е. у типового подвида *A. clerceanus* subsp. *clerceanus*). По ряду аллелей аллозимных локусов между популяциями северного и южного фрагментов ареала имеются качественные отличия (табл. 2), что свидетельствует о генетической дивергенции этих групп популяций.

Для оценки степени генетической близости или разобщенности исследованных популяций на основе аллельных частот проанализированных аллозимных локусов рассчитаны коэффициенты генетического сходства и генетической дистанции по М. Неи (Nei, 1978) (табл. 3). Ординация изученных популяций *A. clerceanus* с помощью анализа главных координат, выполненная на основании генетических дистанций D_N , показала четкое обособление группы северных популяций от южных по оси 1 (рис. 2). Сравнение объединенной выборки северной группы популяций с южной группой по частотам аллелей аллозимных локусов в программе BIOSYS-1 с использованием хи-квадрат критерия показало, что эти две группы достоверно различаются на очень высоком уровне значимости ($\chi^2 = 237,5$; d.f. = 25; $p < 10^{-5}$).

В группе «северных» популяций генетически близки между собой популяции «Медвежка» и «Вишнёвая», хотя они разобщены на 120 км. В то же время популяции, находящиеся в относительно тесном соседстве (местонахождения «Медвежка», «Северка» и «Палкино» западнее г. Екатеринбурга), заметно различаются в генетическом плане (табл. 3, рис. 1, 2). Интродукционная популяция «Участок», репродуцированная из семян популяции «Медвежка» и воспроизводимая самосевом в течение многих лет в живой коллекции редких видов в Ботаническом саду УрО РАН (табл. 1), заняла промежуточное положение между географически наиболее близкими популяциями «Медвежка» и «Северка». Неоднородность по частотам аллелей аллозимных локусов среди популяций северной группы подтверждена статистически ($\chi^2 = 406,4$; d.f. = 68; $p < 10^{-5}$). Статистически значимо различаются по частотам аллелей и популяции южной группы ($\chi^2 = 114,1$; d.f. = 16; $p < 10^{-5}$). Эти различия могли возникнуть в связи с низкой эффективной численностью изолированных популяций (табл.

1) и происходящими в них стохастическими процессами (дрейф генов, эффект основателя и пр.) (Ayala, 1984).

По всей видимости, три соседние популяции к западу от Екатеринбурга («Медвежка», «Северка» и «Палкино») в период доминирования

на Среднем Урале плейстоценовых холодных лесостепей 11–12 тысяч лет назад представляли единую ценопопуляцию, но были разобщены при восстановлении лесов. Новейшие палеозоологические исследования (Kosintsev, Bachura, 2013) показали, что замещение плейстоценовых

Таблица 2

Частоты аллелей полиморфных локусов по восьми ферментным системам в популяциях *Astragalus clerceanus*

Локус	Аллель	Популяции						
		Вишнёвая	Медвежка	Участок	Палкино	Северка	Аккаваз	Караяр
6-pgd-1	1	1,000	0,952	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	2	0,000	0,048	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6-pgd-2	1	0,000	0,097	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,680	0,871	1,000	0,917	0,938	1,000	1,000
Got-2	3	0,320	0,032	0,000	0,083	0,063	0,000	0,000
	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,048	0,000
	2	0,000	0,000	0,000	0,077	0,000	0,000	0,000
	3	0,683	0,726	0,278	0,577	0,250	0,929	0,325
	4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050
	5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,024	0,175
	6	0,317	0,274	0,722	0,346	0,750	0,000	0,450
	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,024	0,000
Lap-1	2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,025
	3	0,000	0,323	0,278	0,000	0,375	0,262	0,025
	4	0,724	0,613	0,722	0,583	0,563	0,595	0,950
	5	0,276	0,065	0,000	0,417	0,000	0,119	0,000
Adh	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083
	2	0,000	0,000	0,000	0,038	0,000	0,000	0,083
	3	1,000	1,000	0,833	0,192	0,500	1,000	0,833
	4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,438	0,000	0,000
	5	0,000	0,000	0,167	0,769	0,063	0,000	0,000
NADHdh-2	1	0,000	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	1,000	0,984	0,778	1,000	1,000	1,000	1,000
	3	0,000	0,000	0,222	0,000	0,000	0,000	0,000
Pgi-2	1	0,034	0,000	0,000	0,000	0,000	0,262	0,775
	2	0,086	0,290	0,278	0,042	0,125	0,119	0,225
	3	0,690	0,710	0,722	0,875	0,875	0,333	0,000
	4	0,121	0,000	0,000	0,083	0,000	0,286	0,000
	5	0,069	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Aco	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,025
	2	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,850
	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125
Fdh	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,810	0,975
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,190	0,025

Примеч.: заливкой выделены аллели, по которым прослеживаются качественные отличия северных и южных популяций.

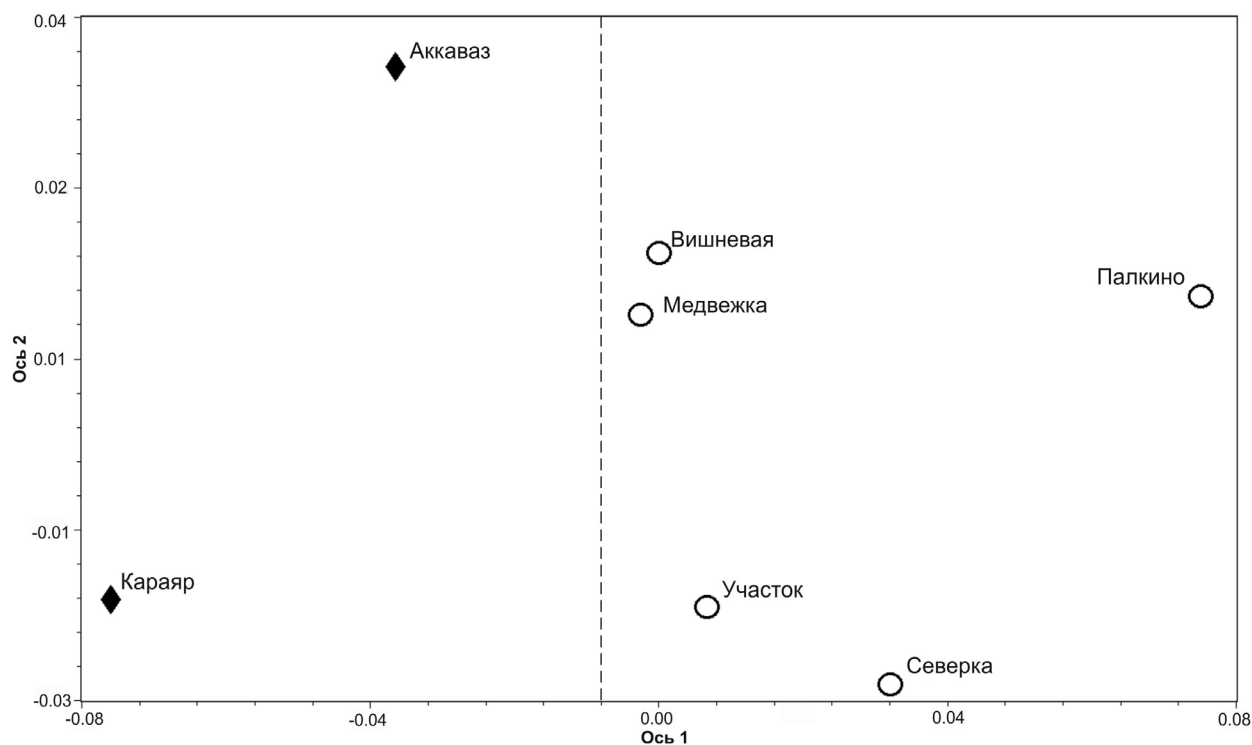


Рис. 2. Ординация изученных популяций *Astragalus clerceanus* s. l. с помощью анализа главных координат, построенная на основе генетических дистанций М. Неи (D_N).

лесостепей лесами в этом регионе произошло в среднем голоцене 5–8 тысяч лет назад. Таким образом, можно достаточно точно определить время, за которое произошла наблюдаемая генетическая дифференциация популяций «Медвежка», «Северка» и «Палкино». Группировка северных популяций в одной половине плоскости ординации (рис. 2) отражает, по всей видимости, результат существенных эволюционных преобразований исходного (предкового) вида (*A. clerceanus* s. l.) и формирование подвида – *Astragalus clerceanus* subsp. *graniticus*.

Важной мерой генетической изменчивости популяции или вида по аллозимным локусам является гетерозиготность (Zhivotovskiy, 1983; Ayala, 1984). Установлено, что полиморфные локусы неравноценны по степени гетерозиготности. У астрагала Клера высокополиморфными (средняя наблюдаемая гетерозиготность более 35 %) являются локусы: Got-2, Lap-1 и Pgi-2. Самая низкая гетерозиготность наблюдается по локусам: 6-Pgd-1 – в популяции «Медвежка» (2,3 %); NADHdh-2 – «Медвежка» и «Участок» (2,3 %); Aco – «Караяр» (1,5 %); Fdh – «Аккаваз», «Караяр» (3,8 %). Установлено, что локусы Aco и Fdh являются мономорфными в «северных» популяциях (у *A. clerceanus* subsp. *graniticus*) и становятся полиморфными в южном фрагменте ареала (у типового подвида).

Между популяциями *A. clerceanus* выявлены существенные различия по величине гетерозиготности. Наблюдаемая гетерозиготность максимально (на 60 %) различается по гену Adh между популяциями «Участок» и «Северка»; и на 46 % у «Караяр» и «Участок» по локусу Lap-1. Различия по этому показателю варьируют по всем локусам для разных популяций. Различия по величине ожидаемой гетерозиготности меняются в пределах от 25 до 50 % по разным локусам и для разных пар популяций. Выраженная географическая закономерность в увеличении гетерозиготности от северных к южным популяциям прослеживается для локусов Aco и Fdh, тогда как по локусу Lap-1 закономерность обратная. Во всех популяциях, кроме популяции «Вишнёвая», уровень наблюдаемой гетерозиготности ниже теоретически ожидаемого согласно уравнению Харди-Вайнберга. Это вполне согласуется с тем, что именно популяция «Вишнёвая» отличается максимальной численностью и наибольшей возможностью генетического обмена между соседними колониями вдоль практически непрерывной полосы, около 8 км по протяженности по гребню увала Вишнёвые горы.

На основании частот аллелей девяти локусов были рассчитаны основные показатели генетического полиморфизма, отражающие уровень изменчивости в популяциях астрагала (табл. 4).

Таблица 3

Генетическое сходство и дистанции между популяциями *Astragalus clerceanus* по данным аллозимного анализа

Популяция	Вишнёвая	Медвежка	Участок	Палкино	Северка	Аккаваз	Караяр
Вишнёвая		0,985	0,963	0,934	0,946	0,966	0,923
Медвежка	0,015		0,977	0,926	0,959	0,976	0,923
Участок	0,038	0,023		0,936	0,986	0,932	0,932
Палкино	0,069	0,077	0,066		0,941	0,900	0,864
Северка	0,056	0,042	0,014	0,061		0,908	0,903
Аккаваз	0,034	0,024	0,071	0,105	0,096		0,936
Караяр	0,080	0,080	0,070	0,146	0,102	0,066	

Примеч.: под диагональю указаны коэффициенты генетической дистанции (D_N), над диагональю коэффициенты генетического сходства (I_N).

Таблица 4

Основные показатели аллозимной изменчивости в популяциях *Astragalus clerceanus*

Популяции	N	$P_{95}\%$	$P_{99}\%$	H_o	H_e	A	n_e	F	S
Вишнёвая	30	33,3	33,3	0,186	0,152	1,58	1,18	–0,22	0
Медвежка	31	33,3	50,0	0,143	0,143	1,67	1,17	0	0
Участок	9	41,67	41,67	0,166	0,195	1,42	1,24	0,83	0,9
Палкино	13	41,67	41,67	0,119	0,154	1,67	1,18	0,23	0,37
Северка	8	41,67	41,67	0,125	0,160	1,58	1,19	0,22	0,36
Аккаваз	21	41,67	41,67	0,143	0,190	1,50	1,23	0,23	0,37
Караяр	20	41,67	50,0	0,114	0,146	1,58	1,17	0,22	0,36
Среднее значение		33,71	42,99	0,146	0,159	1,57	1,19	0,11	0,23

Примеч.: N – количество исследованных растений; $P_{95}\%$, $P_{99}\%$ – процент полиморфных локусов с учётом 95 и 99%-го критерия; H_o – наблюдаемая гетерозиготность; H_e – ожидаемая гетерозиготность, A – среднее число аллелей на локус; n_e – эффективное число аллелей; F – индекс фиксации; S – доля инбредного потомства.

Вычисленные показатели гетерозиготности следует признать высокими для редкого эндемичного вида. Значения показателя ожидаемой гетерозиготности ($H_e = 0,143$ – $0,190$) для *A. clerceanus* превышают средние значения для популяций эндемичных видов ($H_e = 0,076$) (Godt et al., 1996), редких видов ($H_e = 0,096$) (Gitzendanner, Soltis, 2000) и соответствуют средним значениям, приводимым для бобовых травянистых растений (Kholyna, 2005; Kholyna et al., 2013, 2015). Среднее значение наблюдаемой гетерозиготности ($H_o = 0,146$) также несколько превышает таковое в целом для бобовых ($H_o = 0,125$).

Возможно, установленный для *A. clerceanus* высокий уровень генетического разнообразия обусловлен особенностями системы опыления (самонесовместимостью, перекрестным опылением с помощью насекомых) и достаточной продолжительностью жизни особей (Gorczakovskyi, Zueva, 1984), обуславливающей перекрывание поколений и увеличение эффективной численности популяций. Имеющийся резерв генети-

ческого разнообразия (он может быть связан, в частности, с покоящимися в почве жизнеспособными семенами) у *A. clerceanus* может иметь решающее значение для предотвращения негативных генетических последствий, связанных с малой численностью изолированных популяций, и предоставляет возможность для адаптации и эволюционных преобразований.

Генетическая структура популяций характеризуется не только соотношением частот аллелей и генотипов, но и характером подразделенности населения популяций на группы генетически близких особей. Степень такой дифференциации можно охарактеризовать с помощью коэффициентов, предложенных С. Райтом (Wright, 1943, 1969) и называемых F-статистиками. Эти величины являются стандартизированными дисперсиями частот аллелей и показывают величину структурного инбридинга субпопуляции относительно всей подразделенной популяции (F_{ST}), особи относительно субпопуляции (F_{IS}) и особи относительно всей подразделенной попу-

ляции (F_{IT}). Эти индексы отражают отклонение от панмиксии и, в конечном счете, определяются соотношением гомозиготных и гетерозиготных генотипов (Altukhov et al., 1997).

Для оценки степени подразделенности популяций на основе аллельных частот девяти полиморфных локусов были рассчитаны значения коэффициентов инбридинга Райта (табл. 5).

Величина F_{IS} находится в пределах от $-0,051$ по 6-Pgd-1 до $0,617$ по Aco, составляя в среднем $0,066$, что подтверждает факт недостатка гетерозигот в исследуемых популяциях (табл. 5). Значение коэффициента F_{IT} составляет в среднем $0,308$, что указывает на недостаток гетерозигот у вида в целом ($30,8\%$). По отдельным локусам показатели F_{IS} и F_{IT} имеют отрицательные значения (6-Pgd-1, 6-Pgd-2, Got-2), тем не менее, в среднем по всем локусам значения положительные. Коэффициент инбридинга популяции

относительно всего вида (F_{ST}) принимает минимальное значение для локуса 6-Pgd-1 ($0,042$) и максимальное для локуса *Adh* ($0,452$), среднее значение показателя составляет $0,259$. Следовательно, на межпопуляционную изменчивость у *A. clerceanus* приходится $25,9\%$ от выявленной генетической изменчивости. В целом, каждая отдельная популяция *A. clerceanus* поддерживает $74,1\%$ генетической изменчивости вида. Величина потока генов (N_m), рассчитанная на основе значения коэффициента F_{ST} , составила $0,715$. Так называемое правило «один мигрант на поколение» гласит, что одной особи на поколение, мигрировавшей в локальную популяцию, достаточно, чтобы преодолеть последствия генетического дрейфа, приводящего к дивергенции популяции (Slatkin, 1985). Поток генов между популяциями астрагала Клера ниже вычисленного минимума позволяет накапливаться генным различиям.

Таблица 5

Показатели генетической подразделенности популяций *Astragalus clerceanus*
по девяти полиморфным локусам

Локусы	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
6-Pgd-1	$-0,051$	$-0,007$	$0,042$
6-Pgd-2	$-0,031$	$0,124$	$0,151$
Got-2	$-0,040$	$0,194$	$0,225$
Lap-1	$0,122$	$0,234$	$0,127$
Adh	$0,055$	$0,482$	$0,452$
NADHdh-2	$0,326$	$0,449$	$0,182$
Pgi-2	$0,039$	$0,280$	$0,307$
Aco	$0,617$	$0,660$	$0,113$
Fdh	$0,327$	$0,424$	$0,145$
В среднем	$0,066$	$0,308$	$0,259$

Примеч.: F_{IS} – коэффициент инбридинга особи относительно выборки; F_{IT} – коэффициент инбридинга особи относительно всего вида в целом; F_{ST} – коэффициент инбридинга выборки относительно всего вида.

Состояние репродуктивной сферы и система скрещивания *A. clerceanus* s. l.

Цветки *A. clerceanus* мотылькового типа собраны в соцветие кисть. Средняя длина зрелых цветков составляет $8,4$ мм (максимальная длина – $12,0$ мм, минимальная – $4,5$ мм). В зрелых цветках пестик обычно длиннее тычиночной трубки, в молодых – находится на одном уровне с тычинками или ниже.

В целом, строение элементов андроеца соответствует норме у растений всех исследованных популяций. В единичных цветках обнаружено явление неравномерного утолщения стенки пыльника, когда толщина эндотеция уменьшалась в основании и на верхушке пыльника в об-

ласти контакта со связником. Отмечены случаи недоразвития генеративной ткани пыльника.

Цветки *A. clerceanus* характеризуются высокими показателями фертильности пыльцевых зерен, которая в среднем составляет более 90% . Соотношение количества фертильной и стерильной пыльцы в рассмотренных популяциях отличается, но незначительно. Только в популяциях «Вишнёвая» и «Медвежка» обнаружены отдельные цветки, в которых стерилизация пыльцевых зерен возростала до 42% .

Зрелые пыльцевые зерна однородные, округлые, диаметр в среднем составляет 24 мкм (20 – 28 мкм). В цветках популяции «Медвежка» встречалось явление разноразмерности пыльцевых зерен – наряду с зернами нормального раз-

мера, встречались выполненные округлые зерна почти в два раза меньшего размера.

Стерильные пыльцевые зерна имеют меньший размер, овально-вытянутую форму, а в цветках популяций «Вишнёвая» и «Медвежка», отличающихся высоким уровнем стерильности, кроме того, обнаружены многочисленные смятые и деформированные зерна.

В молодом цветке пестик сильно изогнут, но в процессе роста выпрямляется. Средняя длина пестика в зрелых цветках составляет 3,9 мм. Средняя длина завязи – 1,8 мм. Длина семязачатков в среднем составляет 277 мкм, а ширина – 236 мкм. При указанной длине завязи в ней закладывается в среднем 15 семязачатков (от 11 до 18) в популяции «Палкино». Такое же среднее число (14,9) семязачатков (от 10 до 18) – в популяции «Вишнёвая». Среднее число семязачатков в популяциях «Караяр» и «Аккаваз» составляет 12 (от 10 до 13), а в популяции «Медвежка» – 16 (от 11 до 20). Обнаружены статистически достоверные различия по числу семязачатков между северными и южными популяциями (критерий Манна-Уитни, $U = 576,5$; $p < 0,01$).

Таким образом, выявлена тенденция к различию северных и южных популяций по числу семязачатков (важному таксономическому признаку).

Согласно классификации И. И. Шамрова (Shamrov, 2008), семязачатки битегмальные, фуникулярные, мезохалазальные, медионуцеллятные или крассинуцеллятные. Микропиле зигзагообразное, образовано обоими интегументами, из которых наиболее массивен наружный интегумент. Нуцеллус представлен однослойной эпидермой. Наиболее развита базальная часть нуцеллуса, в которой различимы гипостаза и постамент. Антиподы сохраняются и в зрелом зародышевом мешке.

Есть существенные различия в размерах и форме зрелых зародышевых мешков между популяциями. В зрелых семязачатках северных популяций зародышевый мешок удлинённой формы, чуть изгибающийся, достигает апикальной области нуцеллуса, длина зародышевого мешка изменяется от 25 до 59 мкм, ширина – от 16 до 29 мкм. В южных популяциях зародышевые мешки округло-овальные, крупнее и достигают в длину 30–89 мкм, а в ширину – 19–48 мкм. Как длина, так и ширина в описанных популяциях статистически достоверно отличаются друг друга (критерий Манна-Уитни, для длины $U = 40,5$; $p < 0,01$; для ширины $U = 303$, $p < 0,01$).

По морфотипу семязачатки разные: в популяции «Палкино» – анакампилотропные, «Медвежка» – анатропные и анакампилотропные, «Вишнёвая» – анатропные, анакампилотропные, гемикампилотропные, «Караяр» и «Аккаваз» – анакампилотропные и гемикампилотропные.

Выявлена избыточность числа семязачатков у *A. clerceanus*: менее половины из них фертильны – потенциально способны развиваться в семена. Уровень стерильности в северных популяциях составляет 49–70 %, а в южных – около 50 %. В южных популяциях *A. clerceanus* семена заметно крупнее, чем в северных (Kniazev, 2007). Повидимому, естественный отбор в южной части ареала благоприятствовал увеличению размеров семян в ущерб их количеству.

Установлены различные причины стерилизации семязачатков: 1) сохранение каллозы в клетках нуцеллуса, особенно в его апикальной части; 2) отсутствие крахмала в зародышевом мешке и окружающих тканях; 3) нарушения в развитии покровов и нуцеллуса, что проявляется в изменении морфотипа семязачатка и недоразвитии проводящих пучков. Безусловным признаком стерилизации также является изменение в строении зародышевого мешка, что проявляется в отсутствии яйцевого аппарата, полярных ядер, антипод, их взаимного расположения в полости зародышевого мешка.

Астрагал Клера является перекрестно опыляемым видом. Как правило, при несовместимом опылении пыльцевые зерна не прорастают на рыльце, или пыльцевые трубки не способны к нормальному росту. В таких случаях пыльцевые трубки массово меняют направление роста и растут в противоположную от рыльца сторону. Незначительное число пыльцевых трубок преодолевает систему самонесовместимости на рыльце и проникает в ткани пестика, но по ходу их роста на верхушке формируются каллозные пробки, имеющие вид булабовидных вздутий, и рост трубки прекращается.

В популяциях «Вишнёвая» и «Аккаваз» отмечались редкие случаи прорастания единичных пыльцевых зерен в пыльниках, а в популяции «Медвежка» для нескольких цветков отмечено явление массового прорастания собственной пыльцы в пыльниках через утонченные участки эндотеция в ткани столбика и на рыльце пестика. В большинстве случаев собственные пыльцевые трубки дорастали только до поверхности рыльца, не прорастая вглубь тканей пестика; тем не менее, в четырех случаях пыльцевые трубки

отмечены в микропиле семязачатка, что свидетельствует о потенциальной возможности для *A. clerceanus* преодоления самонесовместимости и переходе к контактной автогамии.

Заключение

Оценка генетической изменчивости *A. clerceanus* показала высокий уровень аллозимного полиморфизма, по сравнению со многими другими видами семейства Fabaceae, в особенности с уровнями, показанными для эндемичных видов бобовых. Повышенный генетический полиморфизм *A. clerceanus* может быть объяснен облигатным перекрестным опылением, эффективностью семенного размножения.

Анализ генетического разнообразия популяций по частотам аллелей аллозимных локусов и оценка показателей генетической подразделенности популяций *A. clerceanus* свидетельствуют о наличии дрейфа генов. Мелкие изолированные популяции, по-видимому, неоднократно проходили через «бутылочное горлышко», т.е. снижали численность до критически низкой; более того, популяции «Палкино», «Северка» в настоящее время находятся в таком состоянии – численность генеративных особей в них в разные годы колеблется в пределах 8–15. Достаточно высокий уровень внутривидовой дифференциации может быть обусловлен длительной изоляцией популяций и отсутствием достаточного потока генов в течение долгого времени. Полученные данные о значительных генетических различиях между группой южных популяций, произрастающих на известняках, и группой северных популяций, произрастающих на различных некарбонатных горных породах, а также особенности репродуктивной биологии каждой

группы популяций подтверждают мнение М. С. Князева (Kniazev, 2007) о разделении исследованного вида на две географические расы подвидового уровня: *A. clerceanus* subsp. *clerceanus* и *A. clerceanus* subsp. *graniticus*.

Выявлена высокая фертильность пыльцевых зерен и более чем 50 % стерильность семязачатков. Частичная стерилизация семязачатков может быть относительно недавним эволюционным изменением в процессе приспособления предкового степного вида (Gorzakovskiy, 1969) к условиям частичного затенения в лесной зоне – обеспечивает нормальное развитие семян за счет сокращения их численности в условиях жесткой экономии пластического материала. Аналогичное явление оптимизации отмечено между признаками размер семян/ число зачатков (семян) – у южного подвида семена крупнее, но число их меньше. Наши исследования показали, что *A. clerceanus* является облигатным перекрестно опыляющимся растением (энтомофилом). Однако существует потенциальная возможность его перехода к частичному самоопылению.

Благодарности

Авторы благодарят В. Л. Семерикова, возглавляющего лабораторию «Молекулярной экологии растений», где проводился аллозимный анализ в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН.

Исследования проведены по теме НИР АААА-А17-117072810011-1, а также по Программе повышения конкурентоспособности Уральского федерального университета на 2013–2020 гг. (соглашение 02.А03.21.0006).

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Ayala F. J. 1984. *Vvedeniye v populyazionnyuyu i evolyuzionnyuyu genetiku* [Population and Evolutionary Genetic]. MIR, Moscow, 232 pp. [In Russian]. (Айала Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику. М.: Мир, 1984. 232 с.).
- Altuchov Yu. P., Salmenkova E. A., Omel'chenko V. T. 1997. *Populyazionnaya genetika lososevykh ryb* [The population genetics of salmonids]. Nauka, Moscow, 288 pp. [In Russian]. (Алтухов Ю. П., Салменкова Е. А., Омел'ченко В. Т. Популяционная генетика лососевых рыб. М.: Наука, 1997. 288 с.).
- Ekspress-metody opredeleniya fertlnosti zarodyshevykh meshkov lyuzerny [Express-methods of determining fertility embryonic sacks of burclovers]. 1988. Practical recommendations. VIR, Leningrad, 4–9 pp. [In Russian]. (Экспресс-методы определения фертильности зародышевых мешков люцерны. Методические указания / сост. Л. И. Орел, Л. Н. Константинова, Н. И. Дзюбенко, Е. Б. Казачковская. Л.: ВИР, 1988. С. 4–9).
- Gitzendanner M. A., Soltis P. S. 2000. Pattern of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *Amer. J. Bot.* 87: 783–792.
- Godt M. J. W., Johnson B. R., Hamrich J. L. 1996. Genetic diversity and population size in four rare southern Appalachian plant species. *Conservation Biology* 10: 796–805.

Gorczaikovskiy P. L. 1969. *Osnovnyye problemy istoricheskoy fitogeografii Urala* [The principal problems of Historical Phytogeography of the Urals]. Urals Depart. of Acad. Scien. USSR Press, Sverdlovsk, 286 pp. [In Russian]. (**Горчаковский П. Л.** Основные проблемы исторической фитогеографии Урала. Свердловск, 1969. 286 с.).

Gorczaikovskiy P. L., Zueva V. N. 1984. Age structure and dynamics of small isolated populations of some endemic Astragals of the Urals. *Rus. J. Ecol.* 3: 3–11 [In Russian]. (**Горчаковский П. Л., Зуева В. Н.** Возрастная структура и динамика малых изолированных популяций уральских эндемичных астрагалов // Экология, 1984. № 3. С. 3–11).

Il'in M. M., Krasheninnikov H. M. 1924. *Astragalus clerceanus* Iljin et H. Krasch species nova. In.: *Botanicheskiye materialy gerbariya Glavnogo botanicheskogo sada* [The notes of the Principal Botanical Garden Herbarium] 5(8–9): 113–114 [In Russian and Latin]. (**Ильин М. М., Крашенинников И. М.** *Astragalus clerceanus* Iljin et H. Krasch species nova // Ботан. матер. гербария Главного ботанического сада, 1924. Т. 5. № 8–9. С. 113–114).

Kholina A. B. 2005. *Izmechivost i struktura populaziy ostrolodochnika khankayskogo Oxytropis chankaensis Jurts.* [The biodiversity and the population structure of Hanka-lake locoweed *Oxytropis chankaensis* Jurts.]. Avtoreferat dissertazii na soiskaniye kandidata biologicheskikh nauk]. Vladivostok, 20 pp. [In Russian] (**Холина А. Б.** Изменчивость и структура популяций остролодочника ханкайского *Oxytropis chankaensis* Jurts.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 2005. 20 с.).

Kholina A. B., Nakonechnaya O. V., Yakubov V. V., Koren' O. G. 2013. Genetic variation in six species of the genus *Oxytropis* DC. (Fabaceae) from Kamchatka Peninsula. *Rus. J. Genet.* 49(10): 1021–1029.

Kholina A. B., Voronkova N. M., Nakonechnaya O. V., Koren' O. G. 2015. Approaches to gene pool conservation of medicinal plant *Oxytropis lanata* (Pall.) DC. (Fabaceae). *Turczaninowia* 18, 1: 99–109 [In Russian]. (**Холина А. Б., Воронкова Н. М., Наконечная О. В., Корень О. Г.** Подходы к сохранению генофонда лекарственного растения *Oxytropis lanata* (Pall.) DC. (Fabaceae) // Turczaninowia, 2015. Т. 18, вып. 1. С. 99–109).

Kniazev M. S. 1994. Fam. *Fabaceae* Lindl. (Leguminosae Juss., Papilionaceae Giseke) – Legumes. In.: *Opredelitel sosudistyykh rasteniy Srednego Urala* [Manual of vascular plants of the Middle Urals]. Nauka Press, Moscow, 277–300 [In Russian] (**Князев М. С.** Сем. Fabaceae Lindl. (Leguminosae Juss., Papilionaceae Giseke) – Бобовые (Мотыльковые) // Определитель сосудистых растений Среднего Урала. М.: Наука, 1994. С. 277–300).

Kniazev M. S. 2007. Astragals (*Astragalus*, Fabaceae) sect. *Craccina* in the Urals. *Bot. Zhurn.* (Moscow & St. Petersburg) 92(8): 1215–1226 [In Russian and Latin]. (**Князев М. С.** Астрагалы (*Astragalus*, Fabaceae) секции *Craccina* на Урале // Бот. журн., 2007. Т. 92, № 8. С. 1215–1226).

Kniazev M. S., Kulikov P. V. 2008. Astragal clerovskiy – *Astragalus clerceanus* Iljin et Krasch. In.: *Krasnaya kniga Rossiyskoy Federatsii. Rasteniya i griby* [The Red Book of the Russian Federation, plants and fungi]. Tovari-shhestvo nauchnykh izdaniy KMK, Moscow, 214–216 pp. [In Russian]. (**Князев М. С., Куликов П. В.** Астрагал клеровский – *Astragalus clerceanus* Iljin et Krasch. // Красная книга Российской Федерации. Растения и грибы. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. С. 214–216).

Kosintsev P. A., Bachura O. P. 2013. Formation of modern ranges of mammals in the Urals during the Holocene. *Zool. Zhurn.* 92(9): 1098–1106 [In Russian]. (**Косинцев П. А., Бачура О. П.** Формирование современных ареалов млекопитающих Урала в голоцене. Зоол. журн. 2013, Т. 92, № 9. С. 1098–1106).

Krasheninnikov H. M. 1939. The principal way of the development of vegetation in the South Urals, in connection with the paleogeography of Northern Eurasia in Pleistocene and Holocene. *Sovetskaya Botanika* [Soviet Botany] 6–7: 67–99 [In Russian]. (**Крашенинников И. М.** Основные пути развития растительности Южного Урала в связи с палеогеографией северной Евразии в плейстоцене и голоцене // Сов. Ботаника, 1939. № 6–7. С. 67–99).

Kulikov P. V. 2005. *Konspekt flory Chelyabinskoy oblasti (sosudistyye rasteniya)* [Synopsis of the flora of the Chelyabinsk region (vascular plants)]. Geotur, Ekaterinburg – Miass, 537 pp. [In Russian]. (**Куликов П. В.** Конспект флоры Челябинской области (сосудистые растения). Екатеринбург – Миасс: Геотур, 2005. 537 с.).

Maslova N. V. 2011. Astragal Klera – *Astragalus clerceanus* Iljin et Krasch. In.: *Krasnaya kniga Respubliki Bashkortostan* [The Red Book of the Republic of Bashkiria. Vol. 1: Plants and mushrooms]. MediaPrint, Ufa, 144 p. [In Russian]. (**Маслова Н. В.** Астрагал Клера – *Astragalus clerceanus* Iljin et Krasch. // Красная книга Республики Башкортостан. Т. 1. Растения и грибы / под ред. Б. М. Миркина. Уфа: МедиаПринт, 2011. С. 144).

Mikhailova T. P. 1989. *Astragalus* L. In.: *Opredelitel sosudistyykh rasteniy Bashkirskoy ASSR* [Manual of vascular plants of Bashkiria]. Nauka Press, Moscow, 89–102 pp. [In Russian]. (**Михайлова Т. П.** *Astragalus* L. – Астрагал // Определитель высших растений Башкирской АССР. М.: «Наука», 1989. С. 89–102).

Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89(3): 583–590.

Pausheva Z. P. 1980. *Praktikum po citologii rasteniy* [Practice of plant cytology]. «Kolos» Press, Moscow, 304 pp. [In Russian] (**Паушева З. П.** Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1980. 304 с.).

Rolf F. J. 1998. NTSYSpc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.0. User guide. N.Y.; Applied Biostatistics. Inc. Setauret., 37 pp.

Semerikov V. L., Belyaev A. Yu. 1995. Allozyme polymorphism in natural populations and cultivars of red clover *Trifolium pratense* L. *Rus. J. Genet.* 31(6): 697–700 [In Russian] (**Семериков В. Л., Беляев А. Ю.** Аллозимный

полиморфизм в природных популяциях и культурных сортах клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) // Генетика, 1995. Т. 31. № 6. С. 815–819).

Shamrov I. I. 2008. *Semezachatok tsetkovykh raseniy: stroyeniye, funkcii, proiskhozhdeniye* [The flowering plants ovule: structure, function and origin]. КМК, Moscow, 350 pp. [In Russian]. (**Шамров И. И.** Семязачаток цветковых растений: строение, функции, происхождение. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2008. 350 с.).

Slatkin M. 1985. Rare Alleles as Indicators of Gene Flow. *Evolution*. 39 (1): 53–65.

Swofford D. L., Selander R. B. 1981. BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. Heredity*. 72(4): 281–283.

Wright S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114–138.

Wright S. 1969. Evolution and genetics of populations. Vol. 2. Univ. Chicago Press, Chicago, 511 pp.

Zhivotovskiy L. A. 1983. Statistical methods for analysis of gene frequencies in natural populations. In: *Itogi nauki i tekhniki. Obshchaya genetika* [A results of science and technology. Genetics]. Vol. 8. VINITI Press, Moscow, 76–104 pp. [In Russian]. (**Животовский Л. А.** Статистические методы анализа частот генов в природных популяциях // Итоги науки и техники. Общая генетика. Т. 8. М.: ВИНТИ, 1983. С. 76–104).